Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Erlangen
Direktor: Prof.Dr. Fritz Heim

ÜBER DAS INTERMEDIÄRE VERHALTEN DES p-OXYBENZOESÄUREÄTHYLESTERS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde an der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von
Georg Wunderlich
aus Bamberg

957 №184

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dekan: Prof. Dr. N. Henning
Referent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündl. Prüfung: 20. Jan. 1958

https://archive.org/details/IA41548202_0049

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT
DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE

HERAUSGEGEBEN VON

K. H. BAUER HEIDELBERG · L. HEILMEYER FREIBURG I. BR. · K. LANG MAINZ · H. SCHWIEGK MÜNCHEN

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG UND J. F. BERGMANN MÜNCHEN

35. JAHRG., HEFT 16 (S. 823—825) 15. AUGUST 1957

ÜBER DAS INTERMEDIÄRE VERHALTEN DES p-OXYBENZOESÄUREÄTHYLESTERS

Von

FRITZ HEIM, FRED LEUSCHNER
und GEORG WUNDERLICH X)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen

X) D29

Die zum Teil als Konservierungsmittel benutzten Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Butyl-Ester der p-Oxybenzoesäure bezeichnet EICHOLTZ als „Stoffe von hoher pharmakologischer Wirkungsintensität, die beim Menschen sehr ausgeprägte pharmakologische Wirkungen, unübersehbar in der Mannigfaltigkeit der Symptome, erwarten lassen". Er begründet diese Stellungnahme mit dem Hinweis, daß die Ester der p-Oxybenzoesäure — auch nach peroraler Verabreichung — antikonvulsive Eigenschaften entfalten, wenn als Krampfgift eine Cocain-Adrenalin-Lösung verwendet wird. Nach den Untersuchungen seiner Mitarbeiter v. BUBNOFF, SCHNELL und SCHMID werden durch die intraarterielle Injektion von Benzoesäure, p-Oxybenzoesäure und der genannten Ester der p-Oxybenzoesäure die Gefäße der Nieren und des Femoralisgebiets erweitert, erstere nur im Zustand einer durch Adrenalindauerinfusion erzeugten Verengerung. Nach den Befunden der gleichen Autoren lassen sich am Masseterpräparat der Ratte die durch Vorbehandlung mit Prostigmin verstärkten Muskelkontraktionen durch die intravenöse Injektion von Benzoesäure, p-Oxybenzoesäure und der Ester der p-Oxybenzoesäure abschwächen. Da aus der Arbeit von v. BUBNOFF, SCHNELL und SCHMID nicht hervorgeht, bei welcher Plasmakonzentration die pharmakologischen Wirkungen der p-Oxybenzoesäureester auftreten, haben wir an Hand der Angaben über das Gewicht der Versuchstiere (1,1—4 kg, angenommenes mittleres Gewicht 2,5 kg), des Durchflußvolumens der Nieren und Hinterextremitäten und der je Kilogramm und Minute injizierten Estermengen für den p-Oxybenzoesäureäthylester die beim Eintritt der Wirkung im Blut annähernd vorhandenen Esterkonzentrationen berechnet. Für die Versuche an der Ratte wurde das Blutvolumen mit $^1/_{16}$ des Körpergewichts angesetzt und angenommen, daß beim Wirkungseintritt sich die gesamte injizierte Estermenge noch im Blut befindet. Nach diesen Berechnungen betrug beim Eintritt der vasodilitatorischen Wirkung an den Nierenarterien die Esterkonzentration im arteriellen Blut etwa 350 μg/ml und an den Gefäßen der Hinterextremität etwa 133 μg/ml. Die Kontraktionen des Musculus masseter der Ratte wurden durch etwa 158 μg Ester/ml Blut abgeschwächt.

Es ergibt sich nun die Frage, ob bei der praktisch ausschließlich peroralen Aufnahme des Äthylesters die genannten Esterkonzentrationen im Blut jemals erreicht werden, da im Darmlumen, besonders aber in der Leber und in den Nieren mit der fermentativen

Hydrolyse des Esters und weiteren chemischen Umsetzungen der dabei entstandenen Oxybenzoesäure zu rechnen ist. Im folgenden sollen deshalb Untersuchungen mitgeteilt werden, 1. über den fermentativen Abbau des p-Oxybenzoesäureäthylesters in der isoliert durchströmten Mäuseleber, 2. über die nach peroraler Aufnahme des Esters im Serum von Mensch und Hund nachweisbaren Konzentrationen an p-Oxybenzoesäureäthylester, freier Oxybenzoesäure und gebundener, erst nach Säurehydrolyse nachweisbarer p-Oxybenzoesäure.

Methodik

Zur Durchströmung der Leber wurde ein von uns entwickeltes Verfahren angewandt. Ein 10 cm hohes Warburg-Gefäß von 200 ml Fassungsvermögen enthält im unteren Teil 20 bis 25 ml einer für Warmblüterorgane geeigneten Durchströmungsflüssigkeit. $^4/_5$ des Gefäßvolumens sind mit Sauerstoff gefüllt, in der Mitte des Gefäßes befindet sich ein Oxygenator. Er besteht aus einem in den Boden des Gefäßes eingeschmolzenen, mit Glasperlen gefüllten, oben offenen Glaszylinder, dessen Wand vielfach durchlöchert ist. Auf der obersten Glasperlenschicht liegt die Leber. In den Boden und Deckel des Gefäßes sind 2 Glasröhrchen eingeschmolzen, deren äußere Enden durch einen Ventilgummischlauch über eine Schlauchpumpe miteinander verbunden sind. Das Ende des unteren Röhrchens taucht in das Flüssigkeitsreservoir, während an die innere Öffnung des oberen Glasröhrchens über einen in die Pfortader eingebundenen PVC-Katheter die Leber angeschlossen ist. Mittels der Schlauchpumpe wird die Durchströmungsflüssigkeit kontinuierlich durch die Lebergefäße hindurch gepumpt. Die aus den Lebervenen austretende, über die Glasperlen in das Reservoir abtropfende Flüssigkeit wird durch Schüttelbewegungen des Gefäßes im Thermostat dauernd mit Sauerstoff gesättigt. Das Gefäß enthält einen mit NaOH gefüllten Einsatz zur Absorption der Kohlensäure und ist zur Messung des Sauerstoffverbrauchs mit einem weitlumigen, mit Brodiescher Lösung gefüllten Manometer verbunden. Als Durchströmungsflüssigkeit wurde eine mit Phosphat gepufferte Tyrodelösung von $p_H = 7{,}4$ verwendet. Das Durchflußvolumen der Mäuselebern betrug im Mittel 8 ml/min, bei einem Druck von 25—30 mm Hg. Der QO_2 lag zwischen 20 und 22, ein Beweis für die ausreichende Sauerstoffversorgung des Organs.

Die Bestimmungen des p-Oxybenzoesäureäthylesters, der freien p-Oxybenzoesäure und der gesamten (freien und gebundenen) Oxybenzoesäure erfolgten nach folgenden Methoden:

1. Die Bestimmung des p-Oxybenzoesäureäthylesters. Die zu untersuchende Probe wird mit Wasser auf 3 ml aufgefüllt, mit 0,25 ml 5%iger $NaHCO_3$ alkalisch gemacht, anschließend 2mal mit je 20 ml peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt. Nach

Abdampfen des Äthers wird der Rückstand unter Erwärmen in 2 ml Wasser aufgenommen und nach Zugabe von 0,2 ml konz. NaOH 30 min bei Siedetemperatur im Wasserbad hydrolysiert. Anschließend wird mit H_2SO_4 angesäuert und erneut mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand wird unter Erwärmen in 2 ml Wasser aufgenommen, nach Zusatz von 0,2 ml 4%igem Borax, 0,2 ml Diazoreagens [9 ml p-Nitroanilin (3,5 g p-Nitroanilin in 500 ml 3,3%iger HCl) + 45 ml 5%ig Natriumnitrit ad 100 ml H_2O] + 2 ml Aceton wird die Extinktion der entstandenen orange-roten Farbe gemessen und an Hand einer Eichkurve die Estermenge errechnet.

2. Zur Bestimmung der p-Oxybenzoesäure wird die Probe auf 3 ml mit Wasser aufgefüllt, anschließend mit H_2SO_4 angesäuert und in der gleichen Weise verfahren wie bei der Bestimmung des Esters unter Verzicht auf den Hydrolysevorgang.

3. Zur Bestimmung der gesamten im Serum bzw. in der Leber vorhandenen freien und gebundenen Oxybenzoesäuremengen werden die Proben 1 Std mit 30%iger H_2SO_4 im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend wird nach der unter Ziffer 2 angegebenen Methode die darin enthaltende p-Oxybenzoesäure bestimmt.

Versuchsergebnisse

Abb. 1 zeigt die Absorption und Hydrolyse des p-Oxybenzoesäureäthylesters in der durchströmten Leber. Aus dem Verlauf der Kurve 3, die die Summe der Konzentrationen aus intaktem und bereits hydrolysiertem Ester je Milliliter Durchströmungsflüssigkeit angibt, geht hervor, daß in den ersten 2 Versuchsminuten die Absorption des Esters aus der Durchströmungsflüssigkeit, von diesem Zeitpunkt an dessen Hydrolyse und die Abgabe von p-Oxybenzoesäure an die Durchströmungsflüssigkeit überwiegen. Nach einer Durchströmung von 60 min Dauer ergab sich aus 10 Versuchen folgende Bilanz: Von insgesamt 13,360 mg Ester in der Durchströmungsflüssigkeit wurden 0,306 mg = 2,3% als intakter Ester, 9,08 mg = 68% als p-Oxybenzoesäure in der Durchströmungsflüssigkeit und 1,519 mg = 11,3% bei der Gesamthydrolyse der Leber in Form von p-Oxybenzoesäure wiedergefunden. Der größte Teil dieser 1,519 mg dürfte zu Versuchsende bereits als freie p-Oxybenzoesäure in der Leber vorgelegen haben. Der Verlust durch Entnahme der Proben betrug 0,66 mg = 5%. 1,79 mg = 13,4% waren weder als Ester noch als Säure nachweisbar und sind vermutlich zu weiteren Verbindungen, die mit der Methode nicht mehr nachgewiesen

werden können, abgebaut worden. Aus den während 60 min an die Durchströmungsflüssigkeit abgegebenen p-Oxybenzoesäuremengen ergibt sich eine Hydrolysegeschwindigkeit von 0,151 mg Ester/g Leber/min.

Die Untersuchungen an Hunden und Menschen über die Beziehungen zwischen der peroral verabreichten Estermenge und der zu verschiedenen Zeiten

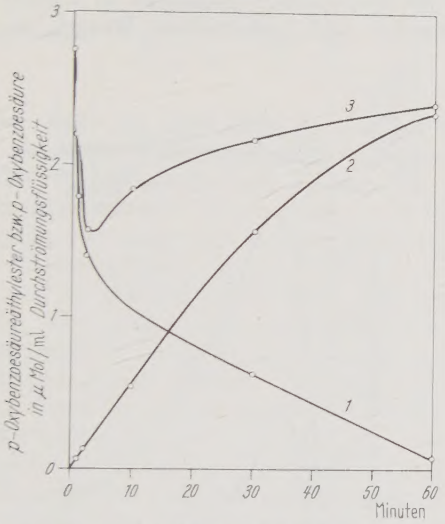

Abb. 1. In vitro durchströmte Mäuseleber bei 37,5° C. Durchströmungsflüssigkeit: O_2-gesättigte, phosphatgepufferte Tyrode pH = 7,4. Kurve 1: p-Oxybenzoesäureäthylester; Kurve 2: p-Oxybenzoesäure; Kurve 3: p-Oxybenzoesäureäthylester + p-Oxybenzoesäure. Mittelwerte aus 10 Versuchen

nach der Aufnahme im Serum gefundenen Konzentrationen an Ester und p-Oxybenzoesäure führten zu folgenden Ergebnissen (Abb. 2). Im Serum von drei Hunden fanden wir nach peroraler Verabreichung von 25 bzw. 100 mg/kg keine nachweisbaren Estermengen. Nach Verfütterung von 500 mg Äthylester/kg war dieser im Serum nachweisbar. Die Konzentration an freier p-Oxybenzoesäure stieg entsprechend den verabreichten Estermengen im Serum an.

Die im Serum von je 6 Versuchspersonen, die 10 mg/kg bzw. 20 mg/kg Äthylester als wäßrige Suspension peroral aufgenommen hatten, gefundenen Mengen an Ester und p-Oxybenzoesäure ergeben sich aus der Tabelle 1.

Die Untersuchungen an der durchströmten Mäuseleber haben ergeben, daß sie mindestens 0,151 mg Äthylester/g Leber/min zu hydrolysieren vermag. Auf die 1,5 kg schwere menschliche Leber umgerechnet entspricht dies einer Hydrolyse von 226,5 mg Ester je Minute[1]. Es hat sich weiterhin ergeben, daß peroral aufgenommene Estermengen bis zu 100 mg/kg Körpergewicht im Warmblüterorganismus so schnell hydrolysiert werden, daß nachweisbare Mengen im Serum

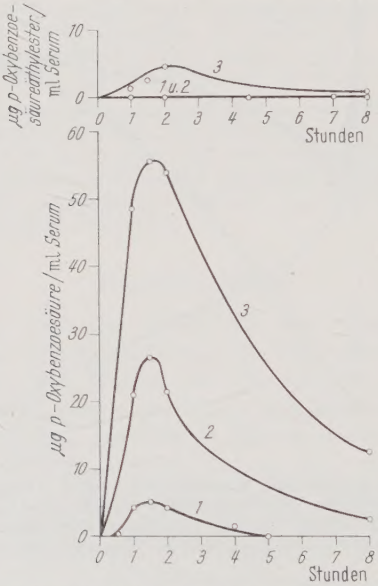

Abb. 2. Serumkonzentration des p-Oxybenzoesäureäthylesters bzw. der p-Oxybenzoesäure nach peroraler Aufnahme von 25 (Kurve 1), 100 (Kurve 2), 500 (Kurve 3) mg p-Oxybenzoesäureäthylester je Kilogramm Körpergewicht. Mittelwerte aus je 3 Versuchen an Hunden

nicht auftreten. Erst nach der peroralen Aufnahme von 500 mg/kg Körpergewicht konnten einige µg Ester/ml Serum nachgewiesen werden. *Da die von einem Erwachsenen in konservierten Lebensmitteln auf einmal aufgenommenen Estermengen kaum jemals* 10 mg/kg Körpergewicht *überschreiten, ist mit dem Auftreten*

[1] Die von einem 70 kg schweren Menschen mit konservierten Lebensmitteln im Laufe einer Mahlzeit in kleinen Dosen aufgenommene Estermenge von insgesamt 0,125 g Ester, die praktisch nicht überschritten wird, würde danach schon in der ersten Minute nach der Resorption zur Säure abgebaut.

Tabelle 1. *Mittelwerte aus je 6 Versuchen am Menschen nach peroraler Aufnahme von 10 bzw. 20 mg p-Oxybenzoesäureäthylester je Kilogramm Körpergewicht*

µg/ml Serum	10 mg Ester/kg			20 mg Ester/kg		
	Stunden nach peroraler Aufnahme					
	1	2¼	4¼	1	2¼	4¼
Ester	0	0	0	0	0	0
p-Oxybenzoesäure . .	1	2	< 0,5	1,5	3,5	0,5
Gesamt	1	2	1,5	3	4,5	1,5

von freiem Ester im Blut nicht zu rechnen. Unsere Befunde stehen in Übereinstimmung mit denen von Jones, Thigpen, Morrison und Richardson, die an 3 Hunden nach peroraler Verabreichung von 1000 mg Äthylester/kg nur nach der 2. Versuchsstunde 7 µg Ester/ml Plasma gefunden haben, während nach der 1., 4., 6. und 24. Std Ester im Plasma nicht nachzuweisen war. Die gleichen Autoren fanden, daß durch 5 mg homogenisierte Leber 96 µg Äthylester innerhalb von 3 min hydrolysiert wurden. Dieser im Verhältnis zu unseren Versuchen am durchströmten, optimal mit Sauerstoff versorgten, intakten Organ sehr hohe Aktivitätsgrad des Leberhomogenats erklärt sich aus dem direkten Kontakt der ganzen Substratmenge mit den aus ihrer Bindung an die Zellstrukturen freigesetzten Fermenten, aus dem Wegfall des normalen Diffusionsweg vom Capillarlumen zur Parenchymzelle und der von Jones und Mitarbeitern verwendeten 100fach höheren Substratkonzentration.

Die von Eicholtz und seinen Mitarbeitern mitgeteilten pharmakologischen Wirkungen des p-Oxybenzoesäureäthylesters wurden durch intraarterielle bzw. intravenöse Zufuhr von Estermengen erzielt, die zu Blutkonzentrationen führten, wie sie nach peroraler Aufnahme des Esters niemals erreicht werden können.

Zusammenfassung. Die bei 37,5° mit Sauerstoffgesättigter Tyrodelösung durchströmte Mäuseleber hydrolysierte mindestens 0,151 mg p-Oxybenzoesäureäthylester/g Leber/min zu p-Oxybenzoesäure.

Nach peroraler Aufnahme von 10—20 mg Ester/kg Körpergewicht lassen sich im Serum des Menschen in

den folgenden 4 Std kein freier Ester, aber p-Oxybenzoesäure nachweisen.

Nach peroraler Verabreichung von 25, 100 und 500 mg Ester/kg ist in den folgenden 8 Std im Serum des Hundes nur nach 500 mg/kg unveränderter Ester nachweisbar. Die p-Oxybenzoesäurekonzentrationen des Serums entsprechen den verabreichten Estermengen.

Literatur. Bubnoff, M. v., D. Schnell u. E. Schmid: Arzneimittel-Forsch. **7**, 364 (1956). — Eicholtz, F.: Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der menschlichen Ernährung. Berlin-Heidelberg-Göttingen 1956. — Jones, P. S., D. Thigpen, J. Morrison and A. P. Richardson: J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. **45**, 268 (1956).

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. Fritz Heim

meinen herzlichsten Dank abzustatten für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Laboratorium des Pharmakologischen Institutes der Universität Erlangen.

Insbesondere erlaube ich mir auch

Herrn Dr. Fred Leuschner

für seine stets freundliche Beratung und seine tatkräftige Unterstützung zu danken.

Lebenslauf

Am 18.2.1924 wurde ich als 1.Kind des Landwirts Heinrich Wunderlich und seiner Ehefrau Li geb. Böhm, in Voccawind, Ufr., geboren. Dort besuchte ich auch von 1930-39 die Volksschule. Der Übertritt in eine höhere Schule, den ich in den Jahren 1934-39 durchführen wollte, wurde mir auf Grund des damals bestehenden Erbhofgesetzes verweigert.

Im August 1945 kehrte ich nach dreijähriger Militärzeit bzw. Gefangenschaft mit einem 40%-igen Kriegsschaden heim und konnte endlich 1947, nach privater Vorbereitung in die Oberschule in Haßfurt eintreten. Im Juli 1949 legte ich an der O.R. in Bamberg das Abitur ab. Im S.S. 1952 immatrikulierte ich an der Universität Erlangen und legte im Juli 1954 die ärztliche Vorprüfung und im Herbst 1957 das medizin. Staatsexamen mit sehr gutem Erfolg ab.

Die Teilnahme an einem Abiturientenkursus im Jahre 1948, der rechtzeitige Beginn des Medizinstudiums im W.S. 1949/50, das Ablegen der ärztl. Vorprüfung nach dem 4. Semester und des Staatsexamens nach der alten Prüfungsordnung, also nach dem 10. Semester, wurden mir von den jeweils zuständigen Behörden nicht erlaubt.

K. UNIV. BIBLIOTHEK LEIDEN